

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-186881

(P2001-186881A)

(43) 公開日 平成13年7月10日 (2001.7.10)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコ-ト* (参考) |
|---------------------------|------|---------------|--------------|
| C 1 2 N 15/09 | | C 1 2 M 1/00 | A 2 G 0 5 8 |
| C 1 2 M 1/00 | | C 1 2 N 11/16 | 4 B 0 2 4 |
| C 1 2 N 11/16 | | C 1 2 Q 1/68 | A 4 B 0 2 9 |
| C 1 2 Q 1/68 | | G 0 1 N 33/53 | M 4 B 0 3 3 |
| G 0 1 N 33/53 | | 33/566 | 4 B 0 6 3 |

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-89979(P2000-89979)

(22) 出願日 平成12年3月28日 (2000.3.28)

(31) 優先権主張番号 特願平11-301627

(32) 優先日 平成11年10月22日 (1999.10.22)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000004064

日本碍子株式会社

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号

(72) 発明者 廣田 寿一

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号 日

本碍子株式会社内

(72) 発明者 則竹 基生

愛知県名古屋市瑞穂区須田町2番56号 日

本碍子株式会社内

(74) 代理人 100077665

弁理士 千葉 剛宏 (外1名)

最終頁に続く

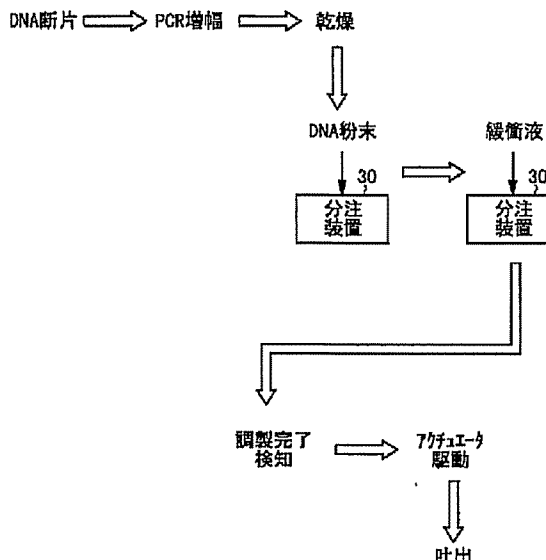
(54) 【発明の名称】 DNAチップの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 試料溶液の品質を劣化させることなく、試料溶液の調製から供給までの処理、あるいはPCR増幅から供給までの処理を一連の工程で行えるようにし、しかも、試料溶液の利用率の向上、試料溶液の保管設備の省略化を実現でき、コストの低廉化、DNAチップの品質の向上を図る。

【解決手段】 DNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する。その後、前記PCR産物を乾燥させてDNA粉末を調製する。その後、DNA粉末を分注装置30における各マイクロピペットの試料注入口にDNA粉末を充填し、次いで、緩衝液を試料注入口からキャビティ内に注入し、試料溶液を調製する。そして、キャビティ内において試料溶液の調製が完成した後、アクチュエータ部を駆動させて、試料溶液を基板上に吐出供給させる。

FIG. 6



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料溶液を基板上に多数供給して DNA チップを製造する DNA チップの製造方法において、DNA 断片を PCR 増幅して PCR 産物を調製する工程と、前記 PCR 産物を乾燥させて DNA 粉末を調製する工程と、溶液の供給装置内に前記 DNA 粉末を供給する工程と、前記供給装置内に緩衝液を供給して試料溶液を調製する工程とを有し、前記供給装置を使用して該供給装置内の前記試料溶液を前記基板上に供給して DNA チップを製造することを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 2】 試料溶液を基板上に多数供給して DNA チップを製造する DNA チップの製造方法において、DNA 断片を PCR 増幅して PCR 産物を調製する工程と、前記調製された PCR 産物を溶液の供給装置内に供給する工程と、前記供給装置内において前記 PCR 産物を乾燥させて DNA 粉末を調製する工程と、前記供給装置内に緩衝液を供給して試料溶液を調製する工程とを有し、前記供給装置を使用して該供給装置内の前記試料溶液を前記基板上に供給して DNA チップを製造することを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 3】 試料溶液を基板上に多数供給して DNA チップを製造する DNA チップの製造方法において、溶液の供給装置内において DNA 断片を PCR 増幅して PCR 産物を調製する工程と、前記供給装置内において前記 PCR 産物を乾燥させて DNA 粉末を調製する工程と、前記供給装置内に緩衝液を供給して試料溶液を調製する工程とを有し、前記供給装置を使用して該供給装置内の前記試料溶液を前記基板上に供給して DNA チップを製造することを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 4】 試料溶液を基板上に多数供給して DNA チップを製造する DNA チップの製造方法において、溶液の供給装置内において DNA 断片を PCR 増幅して PCR 産物を調製する工程を有し、前記供給装置を使用して該供給装置内の前記調製後試料溶液を前記基板上に供給して DNA チップを製造することを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の DNA チップの製造方法において、前記試料溶液をインクジェット方式で供給することを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 6】 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の DNA チップの製造方法において、

前記供給装置は、

少なくとも 1 個以上の基体に、外部から前記試料溶液を注入するための注入口と、前記試料溶液が注入・充填されるキャビティと、前記試料溶液を吐出する吐出口とが形成され、前記キャビティを形成する前記基体の少なくとも一壁面に圧電／電歪素子を備え、前記キャビティ内において前記試料溶液が移動するように構成されたマイクロピペットが複数配列されて構成され、かつ、各マイクロピペットの吐出口からそれぞれ異なる種類の試料溶液が吐出される分注装置であることを特徴とする DNA チップの製造方法。

【請求項 7】 請求項 6 記載の DNA チップの製造方法において、前記複数のキャビティ内における前記試料溶液の調製完了を、前記キャビティ内の流体特性の変化を検知することにより把握することを特徴とする DNA チップの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、顕微鏡スライドガラス等の基板上に、数千から一万種類以上の異なる種類の DNA 断片を微小スポットとして高密度に整列固定させた DNA チップ（DNA マイクロアレイ）の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年における遺伝子構造の解析方法の進歩にはめざましいものがあり、ヒトの遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子構造が明らかにされてきている。このような遺伝子構造の解析には、顕微鏡スライドガラス等の基板上に数千から一万種類以上の異なる種類の DNA 断片を微小スポットとして整列固定させた DNA チップ（DNA マイクロアレイ）が用いられるようになってきている。

【0003】 この DNA チップの製造は、一般的には、DNA 断片を含んだ試料溶液の微小なスポットをガラス等の基板上に複数個配列することによって行われ、微小スポットの形成方法としては、QUILL 方式、ピン&リング方式、あるいはソリッドピン方式といった、いわゆるピンによる基板上への DNA 断片を含んだ試料溶液の供給（打ち込み）を行う方式が広く用いられており、いずれの方法を採用した場合であっても、各微小スポットの容量と形状のばらつきを低く抑えて、各微小スポット間の距離を一定に保つことが重要となる。

【0004】 また、DNA 断片を含んだ試料溶液の調製には、PCR 増幅工程を用い、ごく僅かな元の DNA から、スポットに要する液量まで増幅して用いられることが多いが、増幅によって得られる液量は、数 10 μ リットル程度であり、かつ、増幅に必要な試薬は高価であるため、得られた液の使用効率を上げることが望まれている。

【0005】一方、更なるスポットの高密度化に向けて、微小スポットの形状制御性が良好であり、生産性に優れた新しい方法の開発に対する期待も大きい。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ところで、基板上に、試料溶液の供給による微小スポットを形成する場合、予めカートリッジなどの調製用容器においてDNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製し、得られたPCR産物を乾燥してDNA粉末とし、得られたDNA粉末を緩衝液に溶かして試料溶液を調製するようにしている。

【0007】そして、供給装置に試料溶液を充填し、この供給装置を使用して基板上に試料溶液を供給して、基板上に微小スポットを形成するようにしている。

【0008】この場合、試料溶液を調製する工程と、試料溶液を供給する工程がそれぞれ別々になるため、工程間の管理が別途必要になると共に、試料溶液を保管するための設備が必要になり、また、試料溶液が大気中に触れる機会が多くなることから、試料溶液が変質するおそれがある。

【0009】また、カートリッジなどの調製用容器で試料溶液の調製をするため、調製後の試料溶液をピペットに移す際に、該試料溶液の一部がカートリッジに残存し、更に、ピペットを通じて供給装置に試料溶液を供給する際にも溶液の一部がピペット内に残存することとなり、試料溶液の利用効率の面でも不利になるという問題がある。

【0010】本発明はこのような課題を考慮してなされたものであり、試料溶液の品質を劣化させることなく、試料溶液の調製から供給処理まで一連の工程で行うことができ、しかも、試料溶液の利用効率の向上、試料溶液の保管設備の省略化を実現でき、コストの低廉化、DNAチップの品質の向上を図ることができるDNAチップの製造方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、試料溶液を基板上に多数供給してDNAチップを製造するDNAチップの製造方法において、DNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する工程と、前記PCR産物を乾燥させてDNA粉末を調製する工程と、溶液の供給装置内に前記DNA粉末を供給する工程と、前記供給装置内に緩衝液を供給して試料溶液を調製する工程とを有し、前記供給装置を使用して該供給装置内の前記試料溶液を前記基板上に供給してDNAチップを製造することを特徴とする。

【0012】即ち、この発明においては、DNA粉末と緩衝液を混合して試料溶液を調製する処理と試料溶液を前記基板上に供給する工程を同一の供給装置内で行うようにしている。こうすることにより、調製用容器中の試料溶液を粉末状で供給装置内に移動させるようにしたため、調製用容器内の容器壁等に付着する試料残留物の低

減ができると共に、試料移動用のピペット等を使用することなく、該ピペットに残留、破棄される試料の発生も防げる。

【0013】また、本発明は、DNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する工程と、前記調製されたPCR産物を溶液の供給装置内に供給する工程と、前記供給装置内において前記PCR産物を乾燥させてDNA粉末を調製する工程と、前記供給装置内に緩衝液を供給して試料溶液を調製する工程とを有し、前記供給装置を使用して該供給装置内の前記試料溶液を前記基板上に供給してDNAチップを製造することを特徴とする。

【0014】即ち、この発明においては、PCR産物を乾燥してDNA粉末を調製する処理と、DNA粉末と緩衝液を混合して試料溶液を調製する処理を同一の供給装置内で行うようにしている。

【0015】そのため、乾燥工程における試料の飛散等におけるロスを低減でき、もって試料溶液の利用効率を向上させることができる。更に、1つの供給装置内でDNA粉末の調製から供給処理までを行うため、試料溶液が大気に触れることはほとんどなく、試料溶液の変質を防止することができる。

【0016】更にまた、本発明は、溶液の供給装置内においてDNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する工程と、前記供給装置内において前記PCR産物を乾燥させてDNA粉末を調製する工程と、前記供給装置内に緩衝液を供給して試料溶液を調製する工程とを有し、前記供給装置を使用して該供給装置内の前記試料溶液を前記基板上に供給してDNAチップを製造することを特徴とする。

【0017】即ち、本発明においては、PCR増幅から供給処理までの一連の工程を同一の供給装置内で行うようにしている。そのため、試料溶液の品質を劣化させることなく、試料溶液の調製から供給処理までを一連の工程で行うことができ、しかも、試料溶液の保管設備の省略化を実現でき、コストの低廉化、DNAチップの品質向上を図ることができる。

【0018】また、試料溶液を他の容器に移す工程を行う必要がないため、試料溶液の利用効率を更に向上させることができる。更に、1つの供給装置内で、DNA増幅から供給処理までを行うため、試料溶液が大気に触れることはほとんどなく、試料溶液の変質を防止することができる。

【0019】更にまた、本発明は、溶液の供給装置内においてDNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する工程を有し、前記供給装置を使用して該供給装置内の前記調製後試料溶液を前記基板上に供給してDNAチップを製造することを特徴とする。

【0020】即ち、前記供給装置内において、PCR増幅して得られたPCR産物を直接基板上に供給する。

【0021】こうすることにより、上述した発明の各作

10

20

30

40

50

用・効果に加えて、容器内の試料溶液の調製工程が簡素化され、短時間で効率的にDNAチップを製造することができる。なお、前記供給装置内のPCR産物を含んだ溶液中に、増幅時に作用した試薬で、DNAチップ作製後のハイブリダイゼーション作用を阻害する成分がある場合は、その作用を中和する試薬を注入してもよい。

【0022】そして、前記試料溶液をインクジェット方式で供給することが好ましい。この場合、前記供給装置は、少なくとも1個以上の基体に、外部から前記試料溶液を注入するための注入口と、前記試料溶液が注入・充填されるキャビティと、前記試料溶液を吐出する吐出口とが形成され、前記キャビティを形成する前記基体の少なくとも一壁面に圧電／電歪素子を備え、前記キャビティ内において前記試料溶液が移動するように構成されたマイクロピペットが複数配列されて構成され、かつ、各マイクロピペットの吐出口からそれぞれ異なる種類の試料溶液が吐出される分注装置であることが好ましい。

【0023】これにより、それぞれ種類の異なるPCR産物を乾燥させたDNA粉末、あるいはそれぞれ種類の異なるPCR産物、あるいはPCR増幅する前の元のDNAと、DNA粉末を溶解させる緩衝液、あるいはPCR増幅試薬（プライマー、酵素、PCR緩衝液、dNTP、蒸留水等）等を前記注入口から前記複数のキャビティ内に注入し、場合によっては、注入口部分でPCR産物を乾燥させてDNA粉末を調製する工程を経て、試料溶液を調製した後、前記圧電／電歪素子を駆動させることにより、前記複数のキャビティ内の異なる種類の試料溶液を前記吐出口から吐出させて、DNAチップを製造することができる。

【0024】このように、供給装置内の試料が溜まる部分の容積が数〜数10μリットル程度ある前記インクジェット方式の供給装置は、供給装置内での試料溶液の調製、増幅、精製、作製等に適しており、供給装置の本来の作用である基板上へのスポット形成に加え、そのような作用を合わせ持つことが可能になり、非常に効率のよいDNAチップ製造が可能になる。更に後述するように、供給装置自体をガラス、プラスチック等よりも熱伝導率のよいセラミックスで構成すると、サーマルサイクルを行うPCR増幅に好適である。

【0025】そして、前記複数のキャビティ内における前記試料溶液の調製完了を、前記キャビティ内の流体特性の変化を検知することにより把握するようにしてもよい。前記キャビティを形成する前記基体の少なくとも一壁面に形成された圧電／電歪素子は、キャビティ内の液体の物性を検知するセンサとして作用し、これにより、前記調製完了を精度よく検出することができる。

【0026】

【発明の実施の形態】以下、本発明に係るDNAチップの製造方法の実施の形態例を図1〜図9を参照しながら説明する。

【0027】本実施の形態に係るDNAチップの製造方法においては、図1A〜図1C及び図2に示すような分注装置30を使用する。

【0028】この分注装置30は、矩形状の固定板32の上面に例えば10個のマイクロピペット34を5行2列に配列し、各列方向に整列されたマイクロピペット34群をそれぞれ固定治具36を介して固定板32に固定させた構成を有する。

【0029】マイクロピペット34は、図1C及び図2に示すように、ほぼ直方体の形状を有する基体50の上面に形成された試料注入口52と、該基体50の下面に形成された試料吐出口54と、内部に試料注入口52と試料吐出口54との間に形成されたキャビティ56と、基体50を振動させたり、キャビティ56の体積を変化させたりするアクチュエータ部58とを有して構成されている。

【0030】従って、図2に示すように、前記固定板32には、マイクロピペット34の試料吐出口54に対応する箇所にそれぞれ貫通孔40が設けられている。これにより、マイクロピペット34の試料吐出口54から吐出された試料溶液が、前記貫通孔40を通じて、例えば固定板32の下方に固定された基板10に供給されることになる。

【0031】このマイクロピペット34は、試料注入口52から基体50の内部にかけて開口幅の大きいほぼL字状の導入穴60が形成されている。この導入穴60とキャビティ56との間には、径の小さい第1の連通孔62が形成され、試料注入口52から注入された液体が導入穴60及び第1の連通孔62を通じてキャビティ56に導入されるようになっている。

【0032】キャビティ56のうち、前記第1の連通孔62とは異なる位置に、試料吐出口54に連通し、かつ、第1の連通孔62よりも径の大きい第2の連通孔64が形成されている。本実施の形態では、キャビティ56の下面のうち、試料注入口52寄りに第1の連通孔62を形成し、同じくキャビティ56の下面のうち、試料吐出口54に対応した位置に第2の連通孔64を形成するようにしている。

【0033】更に、この実施の形態では、基体50のうち、キャビティ56の上面が接する部分が薄肉とされ、外部応力に対して振動を受けやすい構造となっており、振動部66として機能するようになっている。振動部66の上面に前記アクチュエータ部58が形成されている。

【0034】基体50は、複数枚のジルコニアセラミックスのグリーンシート（第1の薄板層50A、第1のスペーサ層50B、第2の薄板層50C、第2のスペーサ層50D、第3のスペーサ層50E及び第3の薄板層50F）を積層し、一体焼成して構成されている。

【0035】つまり、基体50は、試料注入口52を構

成する窓部が形成され、一部において振動部66を構成する薄肉の第1の薄板層50Aと、導入穴60の一部及びキャビティ56を構成する複数の窓部がそれぞれ形成された厚肉の第1のスペーサ層50Bと、導入穴60の一部、第1の連通孔62及び第2の連通孔64の一部を構成する複数の窓部がそれぞれ形成された薄肉の第2の薄板層50Cと、導入穴60の一部及び第2の連通孔64の一部を構成する複数の窓部がそれぞれ形成された厚肉の第2のスペーサ層50Dと、第2の連通孔64の一部を構成する窓部が形成された厚肉の第3のスペーサ層50Eと、試料吐出口54を構成する窓部が形成された薄肉の第3の薄板層50Fとを積層し、一体焼成して構成されている。

【0036】アクチュエータ部58は、前記振動部66のほか、該振動部66上に直接形成された下部電極70と、該下部電極70上に形成された圧電／電歪層や反強誘電体層等の圧電層72と、該圧電層72の上面に形成された上部電極74とを有して構成されている。

【0037】下部電極70と上部電極74は、図1Cに示すように、それぞれ基体50の上面に形成された複数のパッド76及び78を通じて図示しない駆動回路に電気的に接続される。

【0038】上記のような構成のマイクロピペット34によれば、上部電極74と下部電極70との間に電界が生じると、圧電層72が変形し、それに伴って振動部66が変形し、振動部66に接しているキャビティ（加圧室）56の容積が減少又は増加することになる。

【0039】このキャビティ56の容積の減少によってキャビティ56内に充填された試料溶液がキャビティ56に連通する試料吐出口54から所定速度で吐出され、図5に示すように、マイクロピペット34から吐出された試料溶液が顕微鏡スライドガラス等の基板10上に微小スポット80として整列固定されたDNAチップ20を作製することができる。また、このキャビティ56の容積増加によって、キャビティ56内に第1の連通孔62から新たな試料溶液が注入、充填され、次の吐出に備えられる。

【0040】なお、アクチュエータ部58の駆動によって、キャビティ56の容積が減少する構造としては、いわゆるインクジェット方式の装置構造を採用することができる（特開平6-40030号公報参照）。

【0041】そして、キャビティ（加圧室）56は、DNA断片などを含む試料溶液が乱れが少なく移動するような流路寸法に形成されている。

【0042】つまり、キャビティ56の寸法は、試料の種類、作成する液滴の大きさ、形成密度より異なるが、例えば、塩基対1~10000程度のDNA断片を100μg/μリットル以下の濃度で×1TEバッファ溶液（緩衝液）に溶解させ、更に、等量のポリマーを含んだ水溶液と混合させた試料を50~600μmピッチで3

0~500μmφ液滴径の供給を行う場合においては、図3に示すように、キャビティ長（L）は、1~5mm、キャビティ幅（W）は、0.1~1mm、キャビティ深さ（D）は、0.1~0.5mmが好ましい。またキャビティ56の内壁には、流れを乱す突起物がないように滑らかであることがよく、その材質は、試料溶液と親和性のよいセラミックスからなることが好ましい。

【0043】このような形状にすることにより、キャビティ56を試料注入口52から試料吐出口54に至る流路の一部として、試料注入口52から導入穴60、第1の連通孔62を経てキャビティ56内に移動する試料溶液の流れを乱すことなく試料吐出口54に導くことができる。

【0044】なお、基体50は、前述したように、ジルコニアセラミックスの一体積層、焼成体であるほかに、アクチュエータ部58を形成したジルコニアセラミック焼結体と金属、樹脂フィルム等との接着体であってもよい。特に、試料吐出口54を形成した薄板層50Fは、その加工法とのマッチングを考慮して、PETフィルム等の有機樹脂をエキシマレーザ等で加工したシート、あるいはステンレスフィルム等の金属を金型等で打ち抜いたシートであることが好ましい。

【0045】また、試料吐出口54と第1の連通孔62の寸法は、吐出する試料溶液の物性、吐出量、吐出速度等によって最適設計されるが、10~100μmφ程度であるといよい。

【0046】ところで、図1Aに示すように、固定板32の上面には、マイクロピペット34を位置決め固定するための複数のピン38が設けられている。マイクロピペット34を固定板32上に固定する場合は、マイクロピペット34の基体50の両側に設けられた位置決め用孔90（図1C参照）に固定板32のピン38を挿入させながら、マイクロピペット34を固定板32に載置することで、自動的に複数のマイクロピペット34が所定の並びで配列位置決めされることになる。

【0047】また、各固定治具36は、複数のマイクロピペット34を固定板32に押さえ付ける押さえ板100を有する。押さえ板100の両端には、それぞれネジ102が挿通される挿通孔が形成され、この挿通孔にネジ102を挿通して、固定板32にねじ込むことによって、前記押さえ板100で一度に複数のマイクロピペット34を固定板32に押さえ付けることができるようになっている。そして、1つの押さえ板100で押さえ付けた複数のマイクロピペット34で1つのユニットが構成される。図1Aの例では列方向に配列された5つのマイクロピペット34で1つのユニットが構成された例を示している。

【0048】また、押さえ板100には、複数のマイクロピペット34を押さえ付けたときに、各マイクロピペット34の試料注入口52に対応する箇所それぞれ試

料溶液を供給するための導入孔104(図1B参照)が形成されており、各導入孔104の上端部にはそれぞれ試料溶液を導入孔104に導くためのチューブ106が保持されている。

【0049】なお、押さえ板100の幅は、配線作業の効率化を考慮すると、複数のマイクロピペット34を固定板32に押さえ付けた際に、アクチュエータ部58の各電極70及び74につながるパッド76及び78が上方に臨むような寸法であることが好ましい。

【0050】このように、上述の分注装置30は、試料注入口52及び試料吐出口54を有するマイクロピペット34の複数個をそれぞれ試料吐出口54を下方方向に向けた状態で立設させて構成されている。

【0051】即ち、各マイクロピペット34は、それぞれの試料注入口52を上側とし、試料吐出口54を下側とし、かつ、各試料吐出口54が縦横に配列配置されて、試料吐出口54からそれぞれ種類の異なる試料溶液が吐出されるようになっている。

【0052】このような構成を有する分注装置30において、各試料注入口52に対応してそれぞれ種類の異なる試料溶液を供給する方法としては、図4に示すように、例えば多数の断面ほぼV字状の凹部(溜め部)110が配列されたカートリッジ112を使用する方法がある。この方法は、カートリッジ112の各凹部110にそれぞれ種類の異なる試料溶液を入れ、該カートリッジ112を各凹部110とチューブ106とがそれぞれ対応するように取り付け、針等で各凹部110の底を開封することによって、各凹部110内の試料溶液をチューブ106を介して各マイクロピペット34に供給する方法等が考えられる。

【0053】また、チューブ106を用いない場合は、カートリッジ112を各凹部110と固定治具36の各導入孔104とがそれぞれ対応するように取り付け、針等で各凹部110の底を開封することによって、各凹部110内の試料溶液を導入孔104を介して各マイクロピペット34に供給する方法のほか、予め、固定治具36における各導入孔104の近傍に針等を形成し、カートリッジ112を固定治具36に取り付けると同時に各凹部110が開封されるようにしてもよい。

【0054】なお、開封後に気体等を圧送し、試料溶液を強制的に押し出す機構を加えてもよい。また、各マイクロピペット34の基体50内に形成された試料注入口52から試料吐出口54に至る空間を洗浄する機構を備えることは、数千から数万種類という多種類のDNA断片などを汚染なく、しかも純度よく微小スポット80として吐出するために望ましい。

【0055】図1Aの例では、押さえ板100の両端をネジ102で固定板20に締め付けることで行っているが、押さえ板100の固定法としては、ネジ、バネ等で機械的に行うほか、接着剤等で行ってもよい。

【0056】また、マイクロピペット34を構成する基体50は、上述したように、セラミックスで形成されており、例えば、安定化ジルコニアや部分安定化ジルコニア、アルミナ、マグネシア、窒化珪素等を用いることができる。

【0057】このうち、安定化/部分安定化ジルコニアは、薄板においても機械的強度が大きいこと、韌性が高いこと、圧電層72や電極材との反応性が小さいことから最も好適に採用される。

【0058】そして、基体50等の材料として安定化/部分安定化ジルコニアを使用する場合には、少なくとも、アクチュエータ部58が形成される部分(振動部66)には、アルミナあるいはチタニア等の添加物が含有されることが好ましい。

【0059】また、アクチュエータ部58を構成する圧電層72は、圧電セラミックスとして、例えば、ジルコン酸鉛、チタン酸鉛、マグネシウムニオブ酸鉛、マグネシウムタンタル酸鉛、ニッケルニオブ酸鉛、亜鉛ニオブ酸鉛、マンガンニオブ酸鉛、アンチモンズ酸鉛、マンガタングステン酸鉛、コバルトニオブ酸鉛、チタン酸バリウム等やこれらのいずれかを組み合わせた成分を含有する複合セラミックスを用いることができるが、本実施の形態においては、ジルコン酸鉛とチタン酸鉛及びマグネシウムニオブ酸鉛からなる成分を主成分とする材料が好適に用いられる。

【0060】これは、このような材料が、高い電気機械結合係数と圧電定数を有することに加え、圧電層72の焼結時における基体材料との反応性が小さく、所定の組成のものを安定に形成することができるに基づくからである。

【0061】更に、本実施の形態では、前記圧電セラミックスに、ランタン、カルシウム、ストロンチウム、モリブデン、タングステン、バリウム、ニオブ、亜鉛、ニッケル、マンガン、セリウム、カドミウム、クロム、コバルト、アンチモン、鉄、イットリウム、タンタル、リチウム、ビスマス、スズ等の酸化物、もしくはこれらいずれかの組合せ、又は他の化合物を適宜、添加したセラミックスを用いてもよい。

【0062】例えば、ジルコン酸鉛とチタン酸鉛及びマグネシウムニオブ酸鉛を主成分とし、これにランタンやストロンチウムを含有するセラミックスを用いることもまた好ましい。

【0063】一方、アクチュエータ部58における上部電極74及び下部電極70は、室温において、固体であって、かつ、導電性の金属で構成されていることが好ましく、例えば、アルミニウム、チタン、クロム、鉄、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛、ニオブ、モリブデン、ルテニウム、パラジウム、ロジウム、銀、スズ、タンタル、タングステン、イリジウム、白金、金、鉛等の金属単体あるいはこれらのいずれかを組み合わせた合金が用

いられ、更に、これらに圧電層72や基体50と同じ材料を分散させたサーメット材料を用いてもよい。

【0064】次に、この分注装置30を使った本実施の形態に係るDNAチップの製造方法について図6～図9を参照しながら説明する。

【0065】まず、第1の実施の形態に係る製造方法は、図6に示すように、DNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する。その後、前記PCR産物を乾燥させてDNA粉末を調製する。その後、各チューブ106からそれぞれ固定治具36の挿入孔104を介して各マイクロピペット34の試料注入口52にDNA粉末を充填し、次いで、緩衝液を試料注入口52からキャビティ56内に注入し、試料溶液を調製する。その後、アクチュエータ部58に対して振動を励起する程度の電圧を印加して、キャビティ56内に充填されている液体を攪拌混合して試料溶液を調製してもよい。そして、キャビティ56内において試料溶液の調製が完成した後、アクチュエータ部58を駆動させて、試料溶液を基板10上に吐出供給させる。

【0066】次に、第2の実施の形態に係る製造方法は、図7に示すように、まず、DNA断片をPCR増幅してPCR産物を調製する。その後、各チューブ106からそれぞれ固定治具36の導入孔104を介して各マイクロピペット34の試料注入口からキャビティ56内にPCR産物を充填する。

【0067】その後、基体50をDNAが変性しない程度の温度で加熱して、PCR産物を乾燥させてDNA粉末を調製する。その後、緩衝液を試料注入口52からキャビティ56内に注入し、試料溶液を調製する。その後、アクチュエータ部58に対して振動を励起する程度の電圧を印加して、キャビティ56内に充填されている液体を攪拌混合して試料溶液を調製してもよい。そして、キャビティ56内において試料溶液の調製が完成した後、アクチュエータ部58を駆動させて、試料溶液を基板10上に吐出供給させる。

【0068】次に、第3の実施の形態に係る製造方法は、図8に示すように、まず、各チューブ106からそれぞれ固定治具36の導入孔104を介して各マイクロピペット34の試料注入口52にDNA断片を充填し、次いで、PCR増幅試薬（プライマー、酵素、PCR緩衝液、dNTP、蒸留水等）を試料注入口52からキャビティ56内に注入する。その後、基体50の加熱冷却を繰り返し、キャビティ56内においてPCR増幅を行う。

【0069】その後、基体50をDNAが変性しない程度の温度で加熱してPCR産物を乾燥させてDNA粉末を調製する。その後、緩衝液を試料注入口52からキャビティ56内に注入し、試料溶液を調製する。その後、アクチュエータ部58に対して振動を励起する程度の電圧を印加して、キャビティ56内に充填されている液体

を攪拌混合して試料溶液を調製してもよい。そして、キャビティ56内において試料溶液の調製が完成した後、アクチュエータ部58を駆動させて、試料溶液を基板10上に吐出供給させる。

【0070】次に、第4の実施の形態に係る製造方法は、図9に示すように、まず、各チューブ106からそれぞれ固定治具36の導入孔104を介して各マイクロピペット34の試料注入口52にDNA断片を充填し、次いで、PCR増幅試薬（プライマー、酵素、PCR緩衝液、dNTP、蒸留水等）を試料注入口52からキャビティ56内に注入する。その後、基体50の加熱冷却を繰り返し、キャビティ56内においてPCR増幅を行う。その後、アクチュエータ部58を駆動させて、試料溶液を基板10上に吐出供給させる。

【0071】ここで、キャビティ56内の加熱方法としては、ヒータ等を用いて固定板32ごと加熱してもよいし、レーザ光、赤外線、電磁波等を用いて基板50を加熱してもよい。また、キャビティ56内の冷却方法としては、空冷式あるいは水冷式の冷却板を固定板32に接触させて冷却してもよいし、代替フロンや液体窒素等からなる冷却剤を基体50に吹きかけてもよい。

【0072】また、図8に示す第3の実施の形態に係る製造方法において、PCR産物の不純物濃度を低減させて、DNAチップの品質を向上させることを目的に、キャビティ56内でのPCR増幅後に、イソプロパノール沈殿等を行い、目的とするDNAの濃縮を行ってもよい。

【0073】なお、イソプロパノール沈殿方法としては、まず、イソプロピルアルコールを試料注入口52からキャビティ56内に注入する。その後、アクチュエータ部58に対して振動を励起する程度の電圧を印加して、キャビティ56内に充填されている液体を攪拌混合する。その後、20分程度放置する。その後、各チューブ106及び貫通孔40をテープ等で封止し、分注装置30ごと遠心機にかけ、目的DNAを沈殿させる。その後、チューブ106からピペット等を用いて溶液を抜き取ることにより、目的DNAの濃縮を行うことが好ましい。

【0074】ところで、キャビティ56内におけるPCR増幅の完了や試料溶液の調製完了は、キャビティ56内の流体特性の変化を検知することにより把握することが好ましい。

【0075】ここで、キャビティ56内の流体特性の変化は、アクチュエータ部58に振動を励起する程度の電圧を印加し、その振動に伴う電気的定数の変化を検出することにより把握する。このような流体特性の変化の検知については、例えば、特開平8-201265号公報に開示されている。

【0076】具体的には、アクチュエータ部58に対して、所定の間隔で、吐出駆動用の電源からの電気的接続

10

20

30

40

50

をリレーで切り離し、同時に、共振周波数を測定する手段をリレーにより接続し、その時点でのインピーダンスあるいは共振周波数を電氣的に測定する。

【0077】これにより、液体の粘度、比重等が目的の試料（DNA断片などを含む液体）であるかどうかを把握することができる。即ち、各マイクロピペット34においては、マイクロピペット34自体がセンサとして機能するため、マイクロピペット34の構成も単純化することができる。

【0078】そして、アクチュエータ部58を、求められるスポット径に応じた液適量に対応した駆動条件にて駆動し、試料溶液の供給を繰り返すことにより、DNAチップ20を製造する。通常、1つの微小スポット80を形成するのに、マイクロピペット34から1〜数百滴を吐出して行う。

【0079】なお、試料注入口52中の試料の量が減少した際には、緩衝液や精製水や塩化ナトリウムを含む水溶液を追加して、流路中に気泡が入らないようにし、吐出を続けることにより、試料溶液をマイクロピペット34内に残すことなく使い切ることができる。試料から置換液への置換の完了（試料吐出の終了）は、同じく、アクチュエータ部58を用いた液体の粘度、比重の検出で行う。

【0080】ここで、キャビティ56内の置換液と試料溶液の置換は層流で行われることが好ましいが、試料溶液の種類が変わった場合や、液体の移動速度が非常に速い場合においては、キャビティ56のうち、第1の連通孔62の近辺部分は、必ずしも層流でなくてもよい。この場合、試料と置換液の混合により、試料溶液のパーージ量は増大するが、キャビティ56内の流体特性の変化を検知することによって、置換完了を判断することにより、パーージ量の増大を最小に抑えることができる。

【0081】また、使用する置換液、試料溶液としては、予め脱気操作を通して溶液中の溶存気体を取り除いたものを使用することが好ましい。そのような溶液を用いることにより、マイクロピペット34の流路内に溶液を充填する際に、流路途中で気泡がひっかり充填が不備になる場合でも、その気泡を溶液中に溶かし込んで不具合を回避できると共に、吐出の途中において、流体中に気泡が発生することがなく、吐出不具合を生じることもない。

【0082】このように、本実施の形態に係るDNAチップの製造方法においては、DNA粉末と緩衝液を混合して試料溶液を調製する処理、あるいはPCR産物を乾燥してDNA粉末を調製した後に緩衝液を混合して試料溶液を調製する処理、あるいはPCR増幅から試料溶液を調製するまでの処理を同一の分注装置30内で行うようにしている。

【0083】そのため、試料溶液の品質を劣化させることなく、試料溶液の調製から供給処理まで、あるいはP

CR増幅から供給処理までを一連の工程で行うことができ、しかも、試料溶液の保管設備の省略化を実現でき、コストの低廉化、DNAチップの品質向上を図ることができる。また、試料溶液を他の容器に移す工程が不要となるため、試料溶液の利用効率を向上させることができる。更に、1つの分注装置30内で試料溶液の調製から供給処理まで、あるいはPCR増幅から供給処理までを行うため、試料溶液が大气に触れることはほとんどなく、試料溶液の変質を防止することができる。

【0084】なお、この発明に係るDNAチップの製造方法は、上述の実施の形態に限らず、この発明の要旨を逸脱することなく、種々の構成を採り得ることはもちろんである。

【0085】

【発明の効果】以上説明したように、本発明に係るDNAの製造方法によれば、試料溶液の品質を劣化させることなく、試料溶液の調製から供給までの処理、あるいはPCR増幅から供給までの処理を一連の工程で行うことができ、しかも、試料溶液の利用効率の向上、試料溶液の保管設備の省略化を実現でき、コストの低廉化、DNAチップの品質の向上を図ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1Aは本実施の形態に係るDNAチップの製造方法で使用される分注装置の構成を示す平面図であり、図1Bはその正面図であり、図1Cは、分注装置を構成する1つのマイクロピペットを示す拡大平面図である。

【図2】マイクロピペットの構成を示す縦断面図である。

【図3】マイクロピペットの基体内に形成されるキャビティを含む流路の形状を示す斜視図である。

【図4】カートリッジと共に示す分注装置の分解斜視図である。

【図5】製造されるDNAチップを示す斜視図である。

【図6】第1の実施の形態に係る製造方法を示す説明図である。

【図7】第2の実施の形態に係る製造方法を示す説明図である。

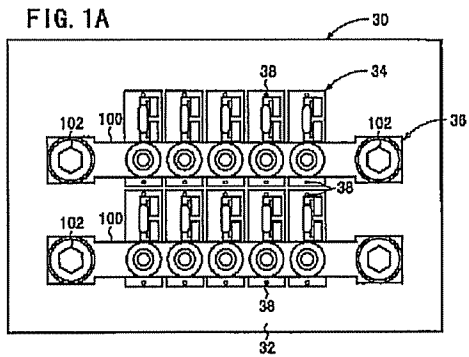
【図8】第3の実施の形態に係る製造方法を示す説明図である。

【図9】第4の実施の形態に係る製造方法を示す説明図である。

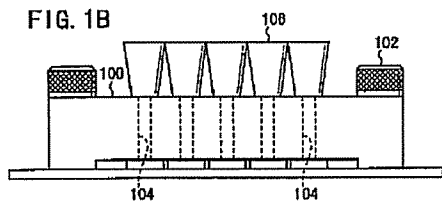
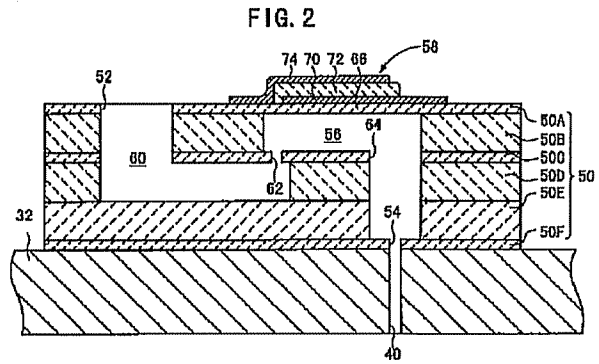
【符号の説明】

| | |
|-------------|-------------|
| 10…基板 | 20…DNAチップ |
| 30…分注装置 | 34…マイクロピペット |
| 50…基体 | 52…試料注入口 |
| 54…試料吐出口 | 56…キャビティ |
| 58…アクチュエータ部 | 80…微小スポット |

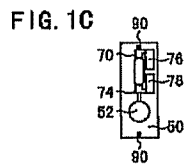
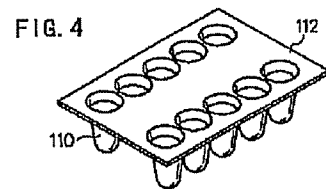
【図1】



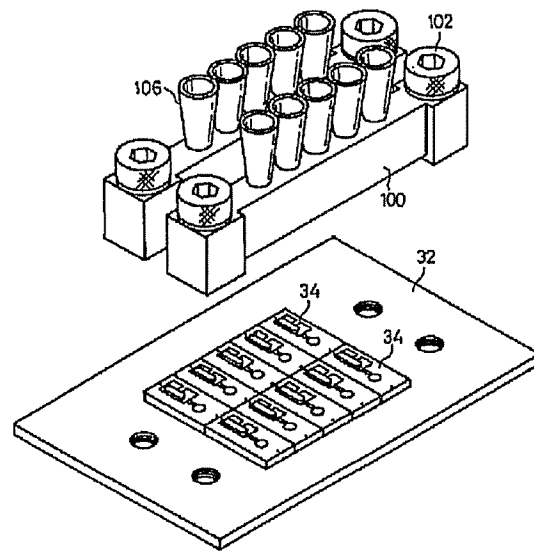
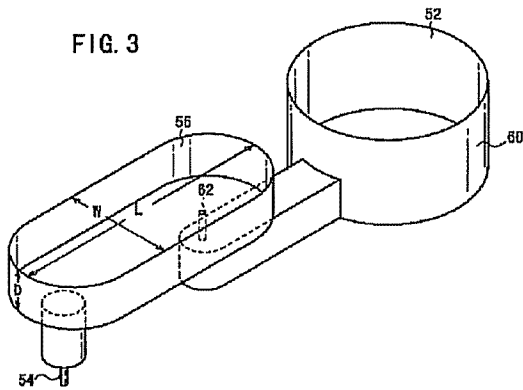
【図2】



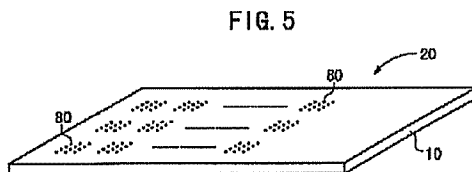
【図4】



【図3】

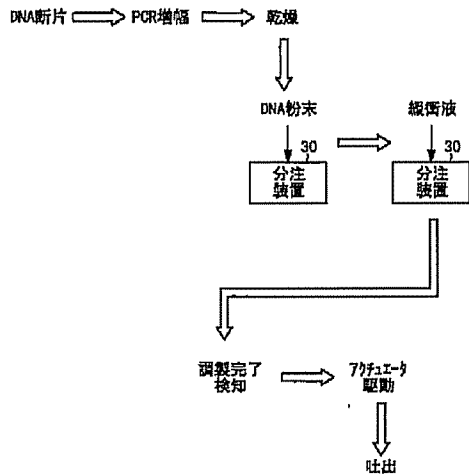


【図5】



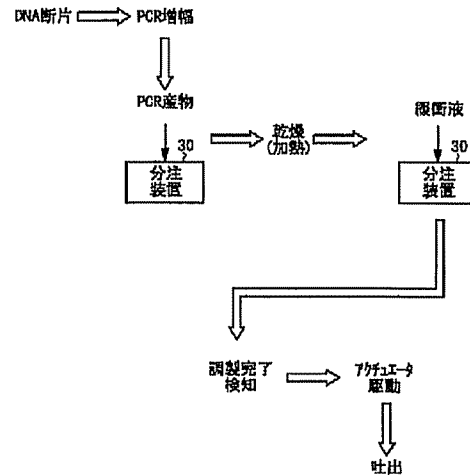
【図6】

FIG. 6



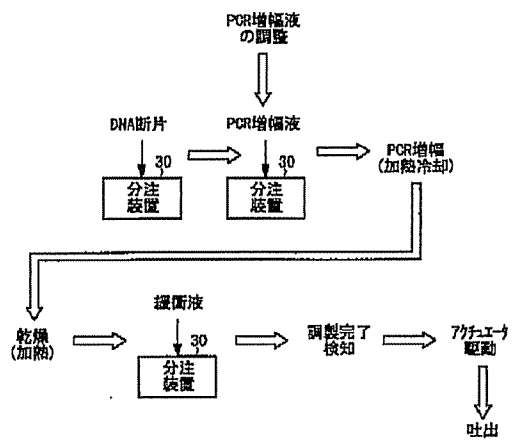
【図7】

FIG. 7



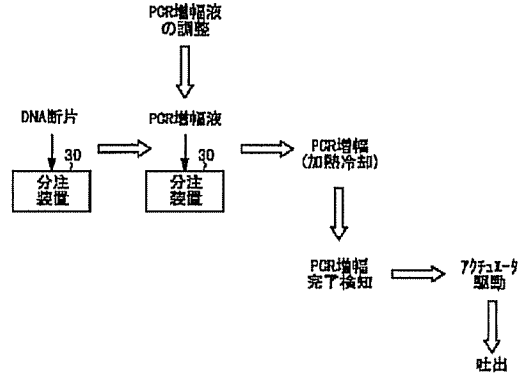
【図8】

FIG. 8



【図9】

FIG. 9



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G 0 1 N 33/566

35/02

35/10

識別記号

F I

G 0 1 N 35/02

C 1 2 N 15/00

G 0 1 N 35/06

ターマコード' (参考)

F

A

A

F ターム(参考) 2G058 AA09 CC09 EA11 ED16 ED20
4B024 AA11 AA19 CA01 HA11
4B029 AA07 AA23 AA27 CC02 CC08
FA15
4B033 NA45 NB02 NB13 NB25 ND08
ND11 NE01
4B063 QA01 QA11 QQ42 QR08 QR42
QR62 QR84 QS25 QS34 QS39

【公報種別】 特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】 第 1 部門第 1 区分

【発行日】 平成 13 年 12 月 25 日 (2001. 12. 25)

【公開番号】 特開 2001-186881 (P2001-186881A)

【公開日】 平成 13 年 7 月 10 日 (2001. 7. 10)

【年通号数】 公開特許公報 13-1869

【出願番号】 特願 2000-89979 (P2000-89979)

【国際特許分類第 7 版】

C12N 15/09

C12M 1/00

C12N 11/16

C12Q 1/68

G01N 33/53

33/566

35/02

35/10

【F I】

C12N 15/00 A

C12M 1/00 A

C12N 11/16

C12Q 1/68 A

G01N 33/53 M

33/566

35/02 F

35/06 A

【手続補正書】

【提出日】 平成 13 年 8 月 6 日 (2001. 8. 6)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0030

【補正方法】 変更

【補正内容】

【0030】 図 2 に示すように、前記固定板 32 には、マイクロピペット 34 の試料吐出口 54 に対応する箇所にそれぞれ貫通孔 40 が設けられている。これにより、マイクロピペット 34 の試料吐出口 54 から吐出された試料溶液が、前記貫通孔 40 を通じて、例えば固定板 32 の下方に固定された基板 10 に供給されることになる。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0065

【補正方法】 変更

【補正内容】

【0065】 まず、第 1 の実施の形態に係る製造方法

は、図 6 に示すように、DNA 断片を PCR 増幅して PCR 産物を調製する。その後、前記 PCR 産物を乾燥させて DNA 粉末を調製する。その後、各チューブ 106 からそれぞれ固定治具 36 の導入孔 104 を介して各マイクロピペット 34 の試料注入口 52 に DNA 粉末を充填し、次いで、緩衝液を試料注入口 52 からキャビティ 56 内に注入し、試料溶液を調製する。その後、アクチュエータ部 58 に対して振動を励起する程度の電圧を印加して、キャビティ 56 内に充填されている液体を攪拌混合して試料溶液を調製してもよい。そして、キャビティ 56 内において試料溶液の調製が完成した後、アクチュエータ部 58 を駆動させて、試料溶液を基板 10 上に吐出供給させる。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】 図面

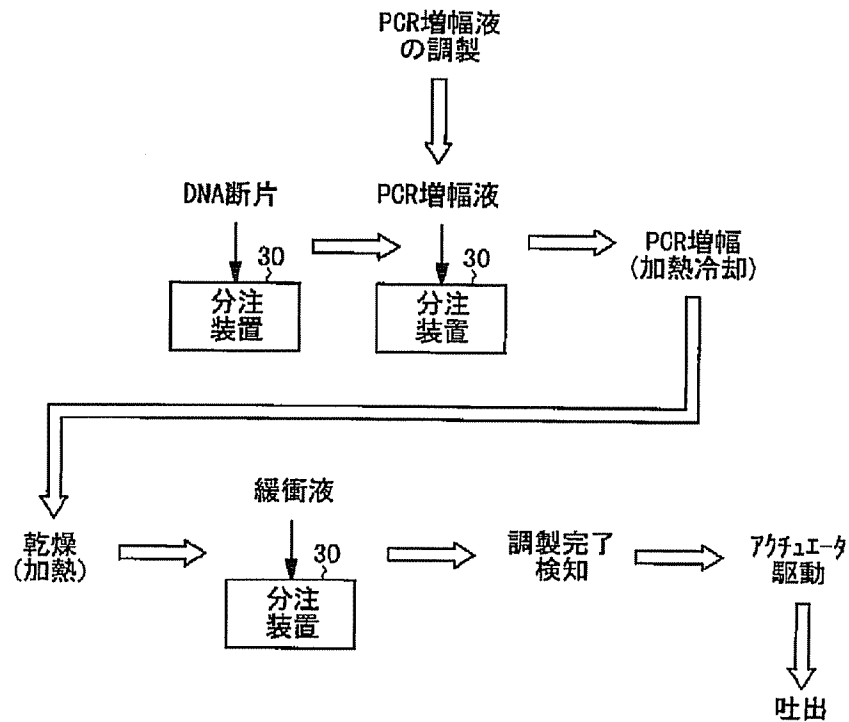
【補正対象項目名】 図 8

【補正方法】 変更

【補正内容】

【図 8】

FIG. 8



【手続補正4】
 【補正対象書類名】図面
 【補正対象項目名】図9

*【補正方法】変更
 【補正内容】

*【図9】
 FIG. 9

